

# MIRを用いる光学的生検に向けた動き

アンジェラ・B・セダン、ブルース・ナピア、イアン・リンジー、サミル・ラムリーニ、ピーター・M・モーズランド、ニック・ストーン、オーレ・バン

光源の帯域幅、明度、ポータビリティの発展によって、リアルタイムかつ *in vivo* (生体内で) MIR イメージングする手法の開発が進んでいる。初期がんの検出などの恩恵につながると期待されている。

初期のがんを、診断できる検査は限られている。がんの後期になってから診断がなされ、それが腫瘍の転移拡散につながってしまう。そこで、早期診断できる新たな技術が重要な研究対象となっている。*in vivo*で医療診断できるかもしれない中赤外イメージング(MIR)が、特に注目されている。実際に欧州委員会は、MINERVA(医療診断向上に向けた中～近赤外分光法)と呼ばれるフレームワークセブン(FP7)プロジェクトを通じて、技術開発への注力を支援している。

### なぜMIRなのか

1800年、サー・ウィリアム・ハーシェル氏(Sir William Herschel)は、プリズムに太陽光を透過させたものを温度計で分析したときに、可視光の虹色のうち赤の外側に「熱線」の存在に気付

いた<sup>(1)</sup>。太陽光に、裸眼で見える周波数よりも短い所に「多様な色」があることを発見し、赤外(IR、ラテン語で「赤の下位」)領域と名付け、幅広い意味をもたせた。それ以降、不可視の多様なIRを、周波数によって3つの領域に分けてきた。すなわち、近赤外(NIR)、中赤外(MIR)、遠赤外(FIR)である(図1)。

MIRの興味深い特徴に、この領域における光波の振動周波数は分子結合の固有振動周波数と一致することが挙げられる。そのため、同じ周波数のMIR光を(共鳴)吸収すると、結合振動量が増加する。分子試料にMIRのさまざまな光を照射し、試料と相互作用した後の光を収集することで、あるMIR周波数の消失がわかる。この技術はMIR分光法と呼ばれており、あらゆる試料に対して使われる。消失または消失しない光周波数の複雑なパターンを、その材

料の固有MIRスペクトルと呼ぶ(図2)。

### 細胞や組織のMIR分子分光法

試料のMIRスペクトルによって、分子構成を検出、同定、さらには定量化できる。多くの分子気体・液体・固体、またヒトの細胞など生体組織を識別できる。それだけでなく、この技術は温室効果ガス、地中・水中・気体中の汚染物質、薬剤、毒性物質、麻薬や爆発物、食品や飲料、石油、石油製品、プラスチックなどにも応用できる。

全ての生体組織は細胞から構成されており、細胞には生体分子が含まれている<sup>(2)</sup>。DNAはその一例である。細胞や組織における生体医学MIR吸光分光計は、*in vivo*(生体内)ではなく、*in vitro*(試験管内)または*ex vivo*(自然の状態から最小限の変化を伴う生体外)で実施できる。生物そのものである生体分

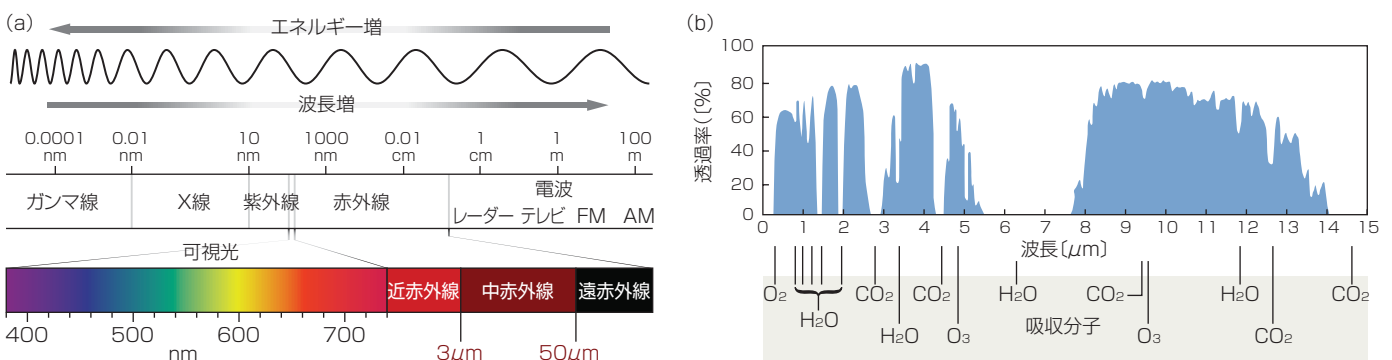
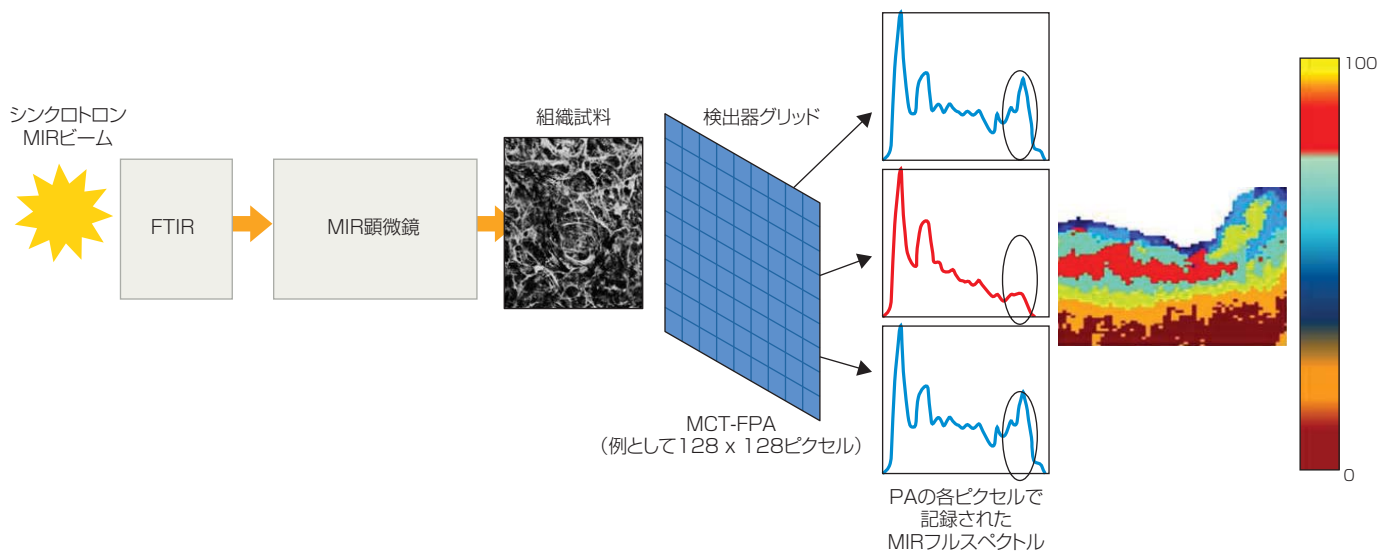


図1 電磁スペクトルの境界値については、科学コミュニティの間で見解が異なる。ISO基準では、中赤外(MIR)領域を3~50 μm(波数は3333~200 cm<sup>-1</sup>)と定義している(a)。この領域には、中波長(MWIR)領域と呼ばれる3~5 μm、長波長(LWIR)領域と呼ばれる8~12 μmという、重要な大気の窓がカバーされている。これらの大気の窓の波長制限は、およそ1マイルの海水位の透過率と一致する<sup>(4)</sup>。二酸化炭素と水分子が特定のMIR周波数においてMIRを吸収するため、MIR光の限られた周波数のみが地球の大気を透過することに注意(b)。



**図2** 切除した生物組織の従来型MIRスペクトルイメージングには、FT-MIR分光計と、MIR顕微鏡上の組織試料を透過するソース（MIR黒体、またはここで描かれているシンクロトロン発生MIRビーム）から構成されるベンチトップの装置が含まれている。MCT-FPA検出器でスペクトルイメージを捉え、各ピクセルでフルスペクトルを記録する。得られたスペクトルのセットは統計的に処理され、疑似カラーマップとして表示されるMIR組織イメージから、分子識別が可能になる。疑似カラーマップは、スペクトルパターンにおける類似性を（数学的に）確立させることで得られる。その後、スペクトルを適切に分類し、主観的割り当てから客観的なマップフリーを作成するためにカラーコードを割り当てる。

子の一群について、そのMIR分光法を理解することは、説得力のある考えだ。

米ノースイースタン大 (Northeastern University) の教授であり、生体医療分光学者のマックス・ディーム氏 (Max Diem) は、*in vitro* または *ex vivo* におけるヒトの細胞や組織のMIR分光法の先駆者である。彼は論文で、従来の方法におけるMIR吸光分光法の使い方は単純化し過ぎており、正常とは異なる悪性の細胞や組織を検出できないと批判した<sup>(3)</sup>。疾患状態と正常状態の組織のMIRスペクトルの変化はわずかであり、複数のMIRスペクトルの統計分析(主成分分析やクラスタリング技術)が、これらの差異を実際に確認するのに必要だという。

ディーム氏は、細胞や組織のMIR分光法は、細胞構成、細胞成分の梱包、器官や細胞の構造、代謝プロセス、疾患の有無に関する大量の情報を得られる可能性を秘めていると強調する。彼が最初に認識したこととして最も重要なことは、細胞や組織から明らかにな

る分光学的情報は、21世紀の病理学を変革させるかもしれないということだ。病理学とは、臓器、組織、細胞、体液の検査を通じて疾患を研究、診断をする分野である。

現在、*ex vivo* の生体医療MIR分子振動吸収分光法については、切除した疾患組織と正常組織と区別できるエビデンスが蓄積されている<sup>(4)</sup>、<sup>(5)</sup>。MIR顕微鏡法と、フーリエ変換 (FT) したMIR分光法を組み合わせたデスクトップ装置である顕微分光計を用いて、MIRスペクトルを収集する (図2)。MIRのさまざまな光源は、通常はシンクロトロンMIRビームか、従来型の黒体タイプのソース (GloBar など) だ。イメージングモードでは、組織試料の側面でMIRスペクトルを収集するときは、焦点面アレイ (FPA) 型のMIR水銀カドミウムテルル (MCT) 検出器を用いる。ピクセルごとに捕らえた組織の平均MIRスペクトル吸収に基づいて、ピクセル化したイメージを直接収集し、疑似カラーマップとして組織試料の分子識別

を描写する。MIR顕微分光法イメージングは、非破壊的、ラベルフリー、高感度であると広く認められており、特に切除組織における *ex vivo* のがん研究や診断に応用されている。MINERVAプロジェクトによる、切除組織の最先端MIR MCT FPAイメージングを**図3**に示す<sup>(5)</sup>。

がん診断における今日のゴールドスタンダードは、色素染色した細胞や組織の顕微鏡観察 (可視光を使用) を含む組織病理学である。ほとんどの大病院には「病理検査室」があり、そこでは患者から採取した切除組織を凍結させ、マイクロームで10 $\mu$ m以下の厚みにスライスし、それぞれ順番に顕微鏡のスライドに乗せ、ヘマトキシリンとエオシン (H&E) 色素で染色し、細胞や組織の形態 (形状) を明らかにする。処理した組織を病理医が調べることで、診断や治療プランを下す。しかしながら、組織病理学は時間も人手もかかり、病理医の判断力に大きく依存している。さらに、生検の結果を待つ間、患者は

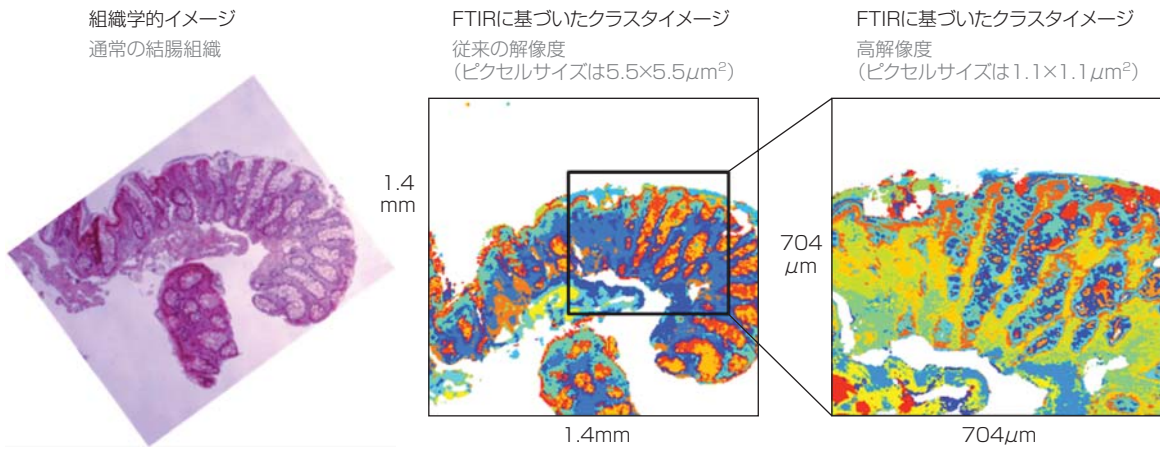


図3 切除した通常結腸組織の最先端MIRスペクトルイメージ(右)では、H&E染色した結腸組織の組織学的顕微鏡写真(左)よりも多くの情報が得られる(英エクセター大(University of Exeter)のN・ストーン氏提供<sup>(5)</sup>)。

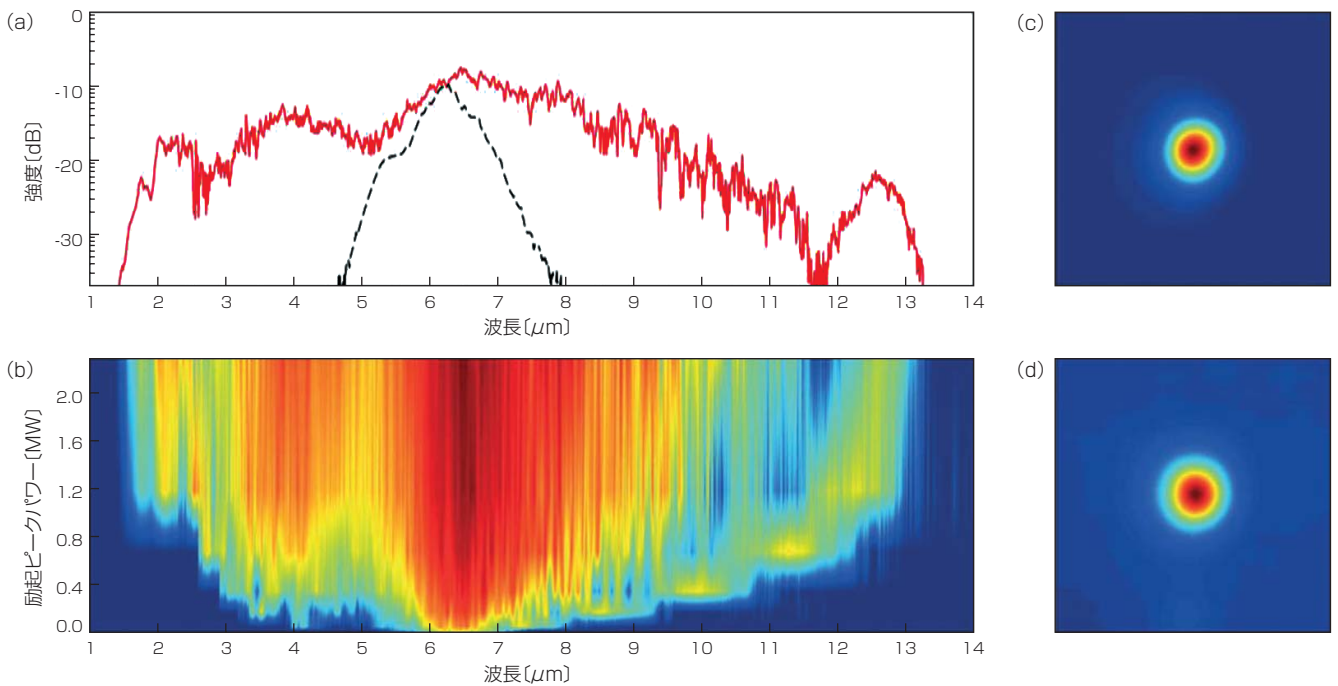


図4 特別調整したMIR光学ファイバにおいて、超広帯域となるスーパーコンティニウム(SC)によって発生する光には、入力励起スペクトル(点線)と最大励起パワー(実線)におけるスペクトルプロファイルが含まれている(a)。広くフラットなスーパーコンティニウム(-20dBで1.64~11.38 $\mu\text{m}$ )と、その隣に13.3 $\mu\text{m}$ まで延びるスペクトルの強いピークがわかる<sup>(9)</sup>。励起ピークパワーを増加させることでスペクトルが放出され、長波長の端で明確なスペクトルピークの漸次な赤方偏位と、それに付随する分散波の形成と青方偏位が見られる(b)。入力励起スペクトルの全波長に対するファイバ出力付近のビームプロファイル(c)と、波長が7.3 $\mu\text{m}$ 以上に対するビームプロファイル(d)。長波長が中心に限定されているのがわかる。この値は、以前に記録されたものを2倍上回る<sup>(10)</sup>。

不安やストレスにさらされる。

### MIRによる *in vivo* イメーjing

MINERVAプロジェクトの目的は、*in vivo* MIR分子振動分光法を実現することだ。身体の*in situ*(その場における)MIR光学生検は、がん診断を早く、リアルタイムに行うことを目的としており、

患者の不安を軽減できる。例えば手術中(MIRファイバレーザ手術中を含む)に、がん境界をMIR内視鏡でモニタリングすることには、ポータブルで高価でないMIR光子システムが含まれるだろう。入院中や外来診療だけでなく、プライマリ・ケア診療の設備でも利用できる。この新しいパラダイムは、

MIR光子デバイスとシステムの集中的な開発によって可能になるだろう。MIR光子デバイスとシステムは、ロバストで機能的にデザインされ、安全かつ小型で、コスト効率がよく、発光側と受光側のMIR光学ファイバに基づいたものとなる<sup>(7)~(9)</sup>。

MIRによる細胞や組織の研究は、弱

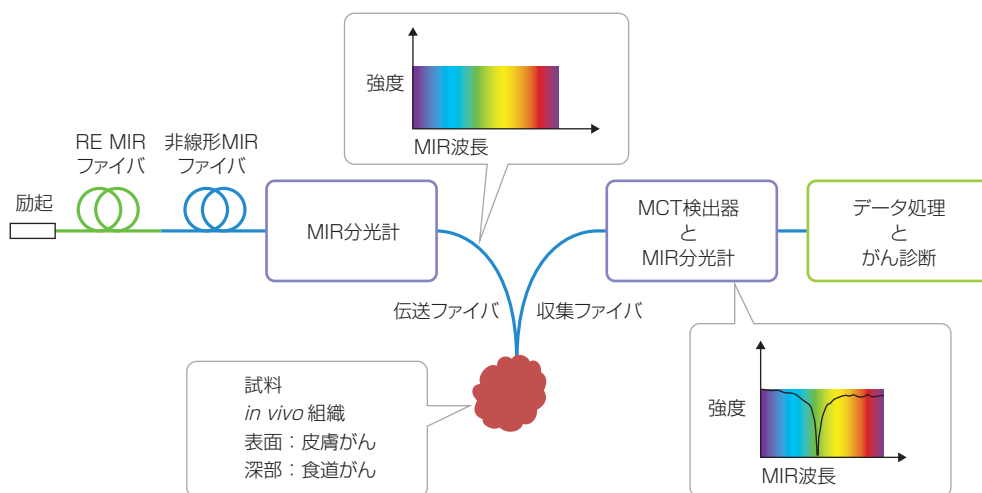


図5 *in vivo* MIRスペクトルバイオイメージング(すなわちMIR光学生検)で提唱されている方法論では、非線形MIRファイバを励起させる希土類元素(RE)のMIRファイバレーザ、つまり高強度なMIRスーパーコンティニウムソースから構成されるベンチトップの装置を用いる。光はFT-MIR分光計を通過し、患者の病変に照射される。受光側のMIRファイバは信号を収集する。光と組織の相互作用からスペクトルのセットが得られ、統計処理されると分子識別と早期のがん診断が可能となる(MINERVAのフェローである、ノッティンガム大のL・ソニカ氏(L. Sojka)のイラストを元に作成)。

い黒体タイプのMIRソース、試料、MIR検出器を十分に近接するようにデザインされたベンチトップのFT-MIR分光計が関与してきた。十分な近接とは、MIR光子が光回路を完全に伝送できる近距離である。その一方で、切除した細胞や組織の試料は、携帯できない、高強度なシンクロトロンMIRソースが必要とする。*in vivo*システムを開発する鍵となるのが、広帯域で非常に明るく、ポータブルなMIR光源だ。

MINERVAプロジェクトでは、英ノッティンガム大(University of Nottingham)のMIRフォトリクスグループがデンマーク工科大の研究者と共同で、特別調整した高数値の開口部をもつMIR光学ファイバを用いることで、超広帯域となるスーパーコンティニウム(SC)によって1.4~13.3 $\mu\text{m}$ の光が発生することを証明した(図4)<sup>(9)</sup>、<sup>(10)</sup>。広帯域のスーパーコンティニウムレーザを示す、この発光側のMIRファイバは、シンクロトロンが発生させるMIR光の強度に匹敵する可能性を秘めている。高強度なMIR広帯域ソースをポータブルパッケージできる可能性を、初めて示したものだ。この研究は他とも共同で行っている<sup>(11)</sup>。

現在の狭帯域のMIRファイバレーザ

では、ファイバの課題解決のために広帯域SCを励起させることが必須である。課題とは、明度、MIR広帯域ソース、コヒーレントな組織イメージングのためのスタンドアロンなデバイス、新たなMIRレーザ手術である(図5)。

光学ロスの低いシリカガラスのファイバが利用できるようになったことで、もう一つの新しい臨床技術である、*in vivo* MIR光学イメージングに向けたラマン散乱の開発が可能になっている。

ラマン効果とMIR吸収は、ともに振動分光法ではあるが、異なる量子力学の選択規則に影響される。MIRアプローチは直接的な基本振動の分子吸収に基づくため、臨床アプリケーションではより感度が高く、優れたコントラストが期待される。ラマン効果は本質的には弱いものの、そのスペクトル出力はMIR吸収を補完するものであり、両者のアプローチによって相乗的に機能するだろう。

#### 参考文献

- (1) W. Herschel, Philos. Trans. R. Soc. Lond., 90, 284-292(1800).
- (2) H. H. Mantsch, foreword to "Biomedical applications of synchrotron infrared microspectroscopy: A practical approach," RSC Analytical Spectroscopy Monographs, 11(2011).
- (3) M. Diem, S. Boydston-White, and L. Chiriboga, Appl. Spectrosc., 53, 4, 148A-161A, 1999.
- (4) H. Sreedhar et al., J. Vis. Exp., 95, 52332(2015); doi:10.3791/52332.
- (5) N. Jayakrupakar, G. R. Lloyd, N. Shepherd, and N. Stone, "High-resolution FTIR imaging of colon tissues for elucidation of individual cellular and histopathological features," Analyst(accepted for publication in 2015).
- (6) A. B. Seddon, "Mid-infrared photonics for early cancer diagnosis," Proc. ICTON, doi: 10.1109/icton.2014.6876433(2014).
- (7) A. B. Seddon, Int. J. Appl. Glass Sci., 2, 3, 177-191(2011).
- (8) A. B. Seddon, Phys. Status Solidi B, 250, 5, 1020-1027(2013).
- (9) R. Petersen et al., Nature Photon., 8, 830-834(2014).
- (10) G. R. Steinmeyer and J. S. Skibina, Nature Photon. News and Views, 8(2014).
- (11) Y. Yu et al., Opt. Lett., 40, 6, 1081-1084(2015).
- (12) A. B. Seddon, Z. Tang, D. Furniss, S. Sujecki, and T. M. Benson, Opt. Express, 18, 25, 26704-26719(2010).
- (13) Z. Tang et al., Opt. Mater. Express, 5, 4, 870-886(2015).
- (14) Z. Tang et al., Opt. Mater. Express, 5, 8, 1722-1737(2015).

#### 著者紹介

アンジェラ・B・セダンはノッティンガム大の中赤外フォトリクスグループの教授、ブルース・ナピアは独ビッド・コンポーネンツ社(Vivid Components Ltd)の研究者、イアン・リンジーは英ゲーチ&ハウスゴ社(Gooch & Housego Ltd)の研究者、サミル・ラムリーニは独LISAレーザプロダクツOHG社(LISA laser products OHG)のレーザ研究者、ピーター・M・モーズランドはデンマークNKTフォトリクスA/S社(NKT Photonics A/S)の研究技師、ニック・ストーンはエクセター大で生体医学分光法チームを率いており、オーレ・バンはデンマーク工科大の教授およびグループリーダーである。